

dr hab. Małgorzata Grzesiak, prof. UJ
Zakład Endokrynologii
Instytut Zoologii i Badań Biomedycznych
Wydział Biologii
Uniwersytet Jagielloński

Kraków, 06 grudnia 2025 r.



UNIwersytet
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

OCENA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

mgr Anny Steg

pt. *"Wpływ suplementacji witaminą D₃ diety świń na transkryptom i proteom w wybranych tkankach"*

Wydział Biologii

Instytut Zoologii

i Badań Biomedycznych

Zakład Endokrynologii

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr Anny Steg, zatytułowana *"Wpływ suplementacji witaminą D₃ diety świń na transkryptom i proteom w wybranych tkankach"*, została wykonana w Zakładzie Biologii Molekularnej Instytutu Zootechniki - Państwowego Instytutu Badawczego w Balicach pod kierunkiem Pani promotor dr hab. Marii Oczkowicz, prof. IZ oraz promotora pomocniczego dr. Grzegorza Smołuchy. Badania zostały sfinansowane w ramach projektu badawczego Preludium Bis 1 Narodowego Centrum Nauki (nr 2019/35/O/NZ9/03148), kierowanego przez Panią promotor.

Pracę doktorską przygotowano w oparciu o dwie oryginalne publikacje naukowe o bardzo spójnej tematyce oraz jedną publikację przeglądową. Wszystkie prace ukazały się w recenzowanych czasopismach z listy *Journal Citation Reports: Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* (IF₂₀₂₅ 2.4), *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* (IF₂₀₂₅ 2.5) oraz *Nutrients* (IF₂₀₂₅ 5.0). Czasopisma te znajdują się również w wykazie czasopism naukowych Ministerstwa Edukacji i Nauk przyznanymi punktami odpowiednio 100, 100 i 140. Publikacje są współautorskie (3-4 autorów) i we wszystkich pracach Doktorantka jest pierwszą autorką. Do każdej publikacji dołączone zostały oświadczenia współautorów, z których wynika, że wkład mgr Anny Steg w prowadzenie badań oraz przygotowanie oryginalnych publikacji jest znaczący i obejmował: opracowanie koncepcyjne założeń pracy, opracowanie metodologii, pobieranie materiału badawczego, wykonanie większości analiz laboratoryjnych (sekwencjonowanie następnej generacji, real-time PCR, elektroforeza dwuwymiarowa, Western blot), przeprowadzenie analizy statystycznej danych, opracowanie i wizualizację otrzymanych wyników, a także udział w przygotowaniu oryginalnych wersji manuskryptów wraz ich korektą po recenzjach. **Po zapoznaniu się z przedłożonymi materiałami stwierdzam, że przedstawiona do recenzji praca doktorska spełnia wymagania formalne stawiane rozprawom doktorskim w rozumieniu zapisu art. 187 ust. 3 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce.**

ul. Gronostajowa 9

30-387 Kraków

tel./fax: +48 12 664 50 98

Gm

Ocena merytoryczna rozprawy doktorskiej

Celem rozprawy była ocena wpływu długotrwałej suplementacji wysokimi dawkami witaminy D₃ na parametry fizjologiczne i cechy reprodukcyjne świń, określenie profilu transkryptomicznego i proteomicznego wybranych tkanek świni (wątroby, mięśni i tkanki tłuszczowej) oraz identyfikacja potencjalnych mechanizmów molekularnych działania witaminy D₃, a także zbadanie czy produkty spożywcze pochodzenia świńskiego mogą być skutecznie wzbogacane w witaminę D₃ w wyniku jej suplementacji w paszy. W mojej opinii praca ma znaczenie wieloaspektowe. Po pierwsze, uzyskane wyniki dostarczają szerokiej wiedzy „omicznej”, która może służyć do zaplanowania bardziej szczegółowych badań funkcjonalnych w zakresie poznania molekularnych podstaw i skutków działania witaminy D₃ w organizmie. Po drugie, praca dostarcza informacji na temat potencjalnie szkodliwych skutków działania wysokich dawek witaminy D₃. Rezultaty przedłożonej rozprawy doktorskiej mogą być również wykorzystane w hodowli i żywieniu trzody chlewnej, co przekłada się na szerokie aspekty konsumenckie spożycia produktów odzwierzęcych. Zatem pozytywnie oceniam wybór tematyki pracy doktorskiej, która ma znaczenie zarówno dla doskonalenia metod hodowli trzody chlewnej, jaki i w żywieniu człowieka.

Rozprawa została przygotowana zgodnie z wymogami formalnymi, a jej układ jest przejrzysty i logiczny. Przedstawione do analizy opracowanie polskojęzyczne obejmuje 63 strony, które zawierają kolejno: informacje o opublikowanych pracach stanowiących podstawę doktoratu, wykaz stosowanych skrótów, streszczenia w języku polskim i angielskim, wstęp, cele pracy wraz z hipotezą badawczą, streszczenie prac naukowych, opis materiałów i metod, omówienie uzyskanych wyników, dyskusję, wnioski, ograniczenia pracy oraz plany na przyszłość oraz bibliografię. Do opracowania dołączono kopie wszystkich publikacji stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej oraz oświadczenia współautorów tych prac.

Wstęp, liczący 14 stron, stanowi wprowadzenie do zagadnień poruszanych w rozprawie doktorskiej i opisuje: metabolizm i mechanizmy działania witaminy D₃, jej szeroką rolę w organizmie, z uwzględnieniem wątroby, tkanki mięśniowej i tłuszczowej, sposoby suplementacji witaminy D₃ i jej toksyczność, uzasadnienie wyboru modelu badawczego i metod badawczych, a na końcu założenia pracy doktorskiej. Ta część rozprawy została przygotowana czytelnie i przejrzysto pod względem merytorycznym i edytorskim, została wzbogacona jedną ryciną i prowadzi do hipotezy badawczej, wyjaśniając cele szczegółowe realizowanych badań. Niektóre fragmenty wstępu pozostają bez cytacji lub jedna cytacja odnosi się do zbyt długiej części. Doktorantka używa skrótu „et al.” we wszystkich cytacjach, jednak ze względu na język polski rozprawy powinna zastąpić go skrótem „i wsp.” lub „i in.”.

Następny rozdział obejmuje cele pracy wraz z hipotezą badawczą. Doktorantka podjęła się weryfikacji hipotezy badawczej zakładającej, że suplementacja diety świń wysokimi dawkami witaminy D₃ (5000 i 10000

IU/kg paszy) prowadzi do zmian w parametrach fizjologicznych, zawartości witaminy D₃ w tkankach oraz profilu ekspresji genów i białek w wątrobie, mięśniach i tkance tłuszczowej. Ponadto koncepcja pracy zakłada, że suplementacja pozwala na efektywne biofortyfikowanie produktów spożywczych pochodzących z trzody chlewnej witaminą D₃. Adekwatnie do założeń pracy, Doktorantka jasno sformułowała 5 głównych celów badawczych, służących weryfikacji postawionych hipotez: 1) Ocena wpływu długotrwałej suplementacji wysokimi dawkami witaminy D₃ na parametry zdrowotne i cechy produkcyjne świń (przyrost masy ciała, wykorzystanie paszy i parametry krwi); 2) Sprawdzenie czy produkty pochodzenia wiejskiego (mięso tłuszcz) mogą być skutecznie wzbogacane w witaminę D₃ pochodzącą z paszy; 3) Określenie wpływu wysokich dawek witaminy D₃ na transkryptom wybranych tkanek (wątroba, mięśnie, tkanka tłuszczowa); 4) Zbadanie czy zmiany w ekspresji genów wywołane suplementacją witaminą D₃ znajdują odzwierciedlenie na poziomie proteomu; oraz 5) Identyfikacja potencjalnych mechanizmów działania witaminy D₃ na poziomie tkankowym.

W rozdziale Materiały i metody, Doktorantka opisuje przebieg eksperymentu żywieniowego, a także wykorzystane metody badawcze. Ten rozdział został przygotowany bardzo starannie a opis przeprowadzonych doświadczeń jest wystarczający. Zastosowane metody badawcze są nowoczesne i zostały dobrane prawidłowo, umożliwiając weryfikację hipotezy badawczej i osiągnięcie zdefiniowanych przez Doktorantkę celów badawczych. Analizy wymagały od Doktorantki dużego nakładu pracy, dlatego opanowanie tak szerokiego wachlarza technik biologii molekularnej, tj. sekwencjonowanie następnej generacji, real-time PCR, elektroforeza dwuwymiarowa, Western blot, analizy bioinformatyczne i testy statystyczne, zasługują w mojej ocenie na duże uznanie.

Kolejny rozdział to Podsumowanie wyników i dyskusja przygotowany na bazie dwóch prac doświadczalnych wchodzących w skład rozprawy doktorskiej. Jest on tożsamy z opisem wyników zamieszczonym w opublikowanych pracach. W pierwszej publikacji oryginalnej, opublikowanej w czasopiśmie *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, Doktorantka badała wpływ suplementacji witaminą D₃ na parametry biochemiczne krwi, zawartość witaminy D₃ we krwi i mięsie oraz profil transkryptomowy tkanki mięśniowej. Co ciekawe, wykazała ona pozytywny wpływ suplementacji na poziom witaminy D₃ we krwi oraz w mięsie bez istotnych zmian w profilu ekspresji genów. Nie stwierdziła natomiast istotnych zmian w parametrach produkcyjnych świń tj. przyrost masy ciała czy pobór paszy. Uzyskane wyniki nasuwają pytanie o zasadność stosowania wysokich dawek witaminy D₃ w żywieniu i produkcji trzody chlewnej. W publikacji, która ukazała się w *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, Doktorantka zbadala wpływ suplementacji wysokimi dawkami witaminy D₃ na ekspresję genów i białek w wątrobie świń. Zarówno analiza transkryptomowa, jak i proteomiczna, wykazały zmiany w ekspresji genów i białek zaangażowanych w β -oksydację kwasów tłuszczowych, a także zmiany

w szlakach związanych z metabolizmem lipidów czy stresem oksydacyjnym. Cykl publikacji został uzupełniony wynikami przedstawionymi jako doniesienie konferencyjne, które dotyczą zmian w transkryptomie tkanki tłuszczowej. Pomimo braku zmian w ekspresji pojedynczych genów, zaobserwowano wzbogacenie szlaku fosforylacji oksydacyjnej oraz niealkoholowej stłuszczeniowej choroby wątroby, co może wpływać na metabolizm energetyczny w tkance tłuszczowej. W mojej opinii wszystkie zadania badawcze zostały prawidłowo i rzetelnie zrealizowane, a postawiona hipoteza poprawnie zweryfikowana.

Ostatnią część opracowania polskojęzycznego stanowią Wnioski, które zostały sformułowane w sposób jasny i logiczny, adekwatnie do otrzymanych wyników. Bardzo cenną częścią przedłożonej do recenzji pracy jest wykazanie istniejących ograniczeń prowadzonych badań oraz przedstawienie planów na przyszłość. Wskazuje to na dojrzałość Doktorantki jako młodego naukowca, który krytycznie podchodzi do swojej pracy. **Podsumowując powyższe stwierdzam, że realizacja celu naukowego postawionego w dysertacji Pani mgr Anny Steg istotnie prowadzi do poszerzenia dotychczasowego stanu wiedzy oraz stanowi przyczynek do rozwiązania oryginalnego problemu badawczego, polegającego na ocenie wpływu suplementacji wysokimi dawkami witaminy D₃ na parametry produkcyjne, fizjologiczne oraz molekularne na poziomie tkanek u świń, spełniając tym samym wymóg ustawy stawiany pracom doktorskim.**

W podsumowaniu stwierdzam, że Doktorantka wykazała się umiejętnościami planowania i prowadzenia badań naukowych, potrafi rozwiązać sformułowany problem naukowy, czego dowodem są krytyczne dyskusje prowadzone w przedłożonych publikacjach. Ponadto Doktorantka wykazała się bardzo dobrym przygotowaniem teoretycznym w zakresie podjętej tematyki badawczej, doskonałym warsztatem laboratoryjnym obejmującym zaawansowane metody biologii molekularnej oraz analizę bioinformatyczną. **Wskazuje to na spełnienie ustawowych kryteriów jakimi powinien charakteryzować się kandydat do stopnia doktora.**

W ocenianej rozprawie trudno jest wskazać słabe strony, ponieważ prace naukowe opublikowano w prestiżowych czasopismach o zasięgu międzynarodowym, i z pewnością zostały one rzetelnie ocenione przez szerokie grono recenzentów oraz edytorów redakcji obu czasopism. Prace napisane są zrozumiale, z jasno sprecyzowanymi celami i prawidłowo przeprowadzoną dyskusją. Dokumentacja wyników w postaci tabel oraz figur jest jasna, czytelna i nie budzi zastrzeżeń. W mojej opinii cała rozprawa doktorska jest przemyślanym, konsekwentnie realizowanym pomysłem badawczym o dużej wartości poznawczej.

Pytania i komentarze do pracy

Podczas analizy prac i opracowania polskojęzycznego rozprawy nasunęło mi się kilka pytań/uwag, którymi chciałabym się podzielić:

1. W przeprowadzonym eksperymencie zwierzęta podzielono na 3 grupy doświadczalne. Grupie kontrolnej podawano paszę bez dodatku witaminy D₃, która jest jednak stałym składnikiem paszy. Dlaczego nie zdecydowano się na podawanie w grupie kontrolnej paszy ze standardową zawartością witaminy D₃?
2. W pracy opublikowanej w czasopiśmie *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* badano poziom kalcydiolu w osoczu krwi. Który dokładnie metabolit badano w mięsie? Zarówno w publikacji jak i opracowaniu polskojęzycznym widnieje jedynie ogólna nazwa „witamina D₃”.
3. W swojej pracy doktorskiej badała Pani wpływ suplementacji paszy wysokimi dawkami witaminy D₃. Czy zastanawiała się Pani nad tym, jakie byłyby efekty podawania niższej dawki witaminy D₃ na globalne zmiany w transkryptomie i proteomie badanych tkanek? Czy istnieją jakieś doniesienia literaturowe w tym temacie?
4. Patrząc globalnie na otrzymane rezultaty z analizy transkryptomicznej, jak mogłaby Pani wytłumaczyć znikome zmiany w ekspresji genów? Jakie czynniki mogły potencjalnie wpłynąć na otrzymane rezultaty?
5. Czy może Pani wskazać największe wyzwania z jakimi się Pani mierzyła podczas prowadzenia swoich badań?
6. Rycina 1 i 2 posiadają opisy w języku angielskim. Ze względu na to, że znajdują się one w polskojęzycznym opracowaniu, powinny być opisane w języku polskim. Brak podanego źródła pod rycinami.
7. Drobne błędy stylistyczne zaznaczone w wersji papierowej rozprawy. Najczęściej pojawiający się błąd to brak konsekwencji w nazewnictwie – często witamina D i D₃ są stosowane zamiennie.

Podsumowanie

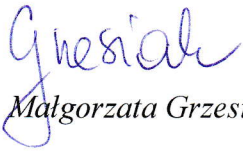
Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Anny Steg jest wartościowym, oryginalnym dziełem naukowym zawierającym nowatorskie wyniki, które poszerzają wiedzę z zakresu hodowli i żywienia zwierząt, a w szczególności wpływu suplementacji witaminy D₃ w paszy u trzody chlewnej. Autorka wykazała się umiejętnością planowania i prowadzenia badań, wnioskowania w oparciu o uzyskane wyniki oraz dużą wiedzą merytoryczną i dobrym przygotowaniem warsztatowym. Opublikowane prace, a także opracowanie polskojęzyczne, będące podstawą rozprawy doktorskiej, zostały bardzo dobrze przemyślane, rzetelnie zrealizowane i starannie przygotowane. Zawarte w niniejszej recenzji pytania czy komentarze nie umniejszają wartości merytorycznej ocenionej bardzo wysoko pracy doktorskiej, lecz są zachętą do naukowej dyskusji i dalszego rozwoju.

Wniosek końcowy

Reasumując stwierdzam, że przedłożona do recenzji praca doktorska Pani mgr Anny Steg pt. *"Wpływ suplementacji witaminą D₃ diety świń na transkryptom i proteom w wybranych tkankach"* w pełni odpowiada wymogom stawianym rozprawom doktorskim i spełnia warunki określone

w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2024 r. poz. 1571) stawianym kandydatom ubiegającym się o uzyskanie stopnia naukowego doktora. **W związku z powyższym przedkładam Wysokiej Radzie Naukowej Instytutu Zootechniki - Państwowego Instytutu Badawczego o dopuszczenie Pani mgr Anny Steg do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk rolniczych w dyscyplinie zootechnika i rybactwo.**

Z wyrazami szacunku,



dr hab. Małgorzata Grzesiak, prof. UJ